This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

Title

Fermentative production of amino acids

Inventor Name

Shiio, Isao,; Ohtsuka, Shinichiro; Kurasawa, Shogo; Uchio, Ryosuke

Patent Assignee

Ajinomoto Co., Inc., Japan

Publication Source

Jpn. Kokoku Tokkyo Koho, 6 pp.

Patent Information

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
JP 45025273	B	19700821	JP 1967-50233	19670805

Abstract

The method for producing amino acid comprising 1) culturing in a medium containing methanol as a major carbon source a strain which belongs to the genus Achromobacter or Pseudomonas, has an ability to utilize methanol and has an ability to have amino acid accumulate, and 2) collecting the amino acid from the medium.

Language

Japanese

(3)

Our Ref. OP1631-US

Prior Art Reference

Japanese Patent Publication (post-examination) No. Sho 45-25273
Publication Date: August 21, 1970
Title: PROCESS OF PRODUCING AMINO ACID BY A FERMENTATION METHOD
Patent Application No. Sho 42-50233
Filing Date: August 5, 1967
Inventors: Isamu TAIBI, Kamakura-shi, Kanagawa-ken, Japan
Shinichiro OTSUKA, Yokohama-shi, Kanagawa-ken, Japan
Shogo KURASAWA, Kawasaki-shi, Kanagawa-ken, Japan
Ryosuke UCHIO, Yokohama-shi, Kanagawa-ken, Japan
Applicant: AJINOMOTO KABUSHIKI KAISHA
Chuo-ku, Tokyo, Japan

- -

Translation of Claim (only one claim):

A process of producing amino acid by a fermentation method comprising the steps of:

inoculating and culturing a strain, which belongs to the *genus Achromobacter* or the *genus Pseudomonas* and which has ability to assimilate methanol and to accumulate amino acid, in a medium containing methanol as a main carbon source;

allowing the culture to produce and accumulate amino acid; and

collecting the produced amino acid.

(52)日本分類
36(2) D 25
36(2) D 35

日本国特許庁

(11)特許出願公告
昭45-25273

(19)特許公報

(44)公告 昭和45年(1970)8月21日
発明の数 1
(全6頁)

1

(54)発酵法によるアミノ酸の製造法

(21)特願 昭42-50233
(22)出願 昭42(1967)8月5日
(72)発明者 堆尾勇
鎌倉市佐助1の18
同 大塚慎一郎
横浜市中区山下町73
同 倉沢瑞伍
川崎市古川町7の3
同 内尾良輔
横浜市保土ケ谷区帷部町5
(71)出願人 味の素株式会社
東京都中央区宝町1の7
代表者 鈴木恭二

発明の詳細な説明

本発明は、メタノールを主炭素源とする培地に、メタノールを資化してアミノ酸を生成蓄積する能力のある微生物を接種し、好気的に培養して、培地中にアミノ酸を生成蓄積せしめ、之を採取することを特徴とする発酵法によるアミノ酸の製造法に係り、その目的とするところは安価でかつ大量の供給が可能なメタノールを炭素源として用い、アミノ酸を工業的に有利に製造することにある。

従来発酵法によるアミノ酸の製造においては、その炭素源を主として農産物に依存してきた。これら原料の生産量および価格によつてアミノ酸製造の経済性が大きく左右され、且つ、それ自体食品として、また食品加工原料として利用し得る農産物を発酵原料に使用することは、近い将来に予測される食糧問題に重大な影響を与えるものである。この点を補うものとして石油、炭化水素例えばケロシン、ナフサ、軽油、重油、メタン、ブタン、エタン等を用いる発酵法も知られているが、優秀資化性菌が得られないため、長期の培養時間を要する。また、これらの炭化水素は水に難溶のため、微生物による資化を促進せしめるためには、水と

2

炭化水素の接触面積を広く保つための装置が必要である等、実用面の問題が多い。

本発明者は有機合成化学工業により大量かつ安価に得られるメタノールを主炭素源に利用することを試み、種々研究の結果、メタノールを炭素源としてアミノ酸を培地中に直接生成蓄積しうる微生物がアクロモバクター属及びシュードモナス属に属する細菌中に存在することを見出し本発明を完成した。

即ち本発明はメタノールを主炭素源とする培地に、アクロモバクター属またはシュードモナス属に属しメタノール資化性、アミノ酸蓄積能を有する菌株を、接種培養し、アミノ酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする発酵法によるアミノ酸の製造法である。

メタノールを唯一の炭素源とする培地に生育しうる微生物の存在はすでに報告されているが、このメタノールを炭素源とするアミノ酸発酵は未だその例をみず、本発明をもつて嚆矢とする。

本発明において使用する微生物は、アクロモバクター属またはシュードモナス属に属し、メタノールを資化してアミノ酸を生成蓄積する能力を有する菌株であるが、その代表的なものとして、アクロモバクター・メタノーロフイラ(Achromobacter methanolophila nov. sp.)及びシュードモナス・インスエタ(Pseudomonas insueta nov.sp.)が挙げられる。そして、これらに属する株としてアクロモバクター・メタノーロフイラF54-1、同F54-2(工発研菌寄第83号)、同F48-3、同F36-1、同F70-1、同E95-1、同E91-1、同E19-2及び同F73-1等が分離されており、又、シュードモナス・インスエタG8-3-2(工発研菌寄第84号)、同G4-1-2及び同F27-3等がある。

アクロモバクター・メタノーロフイラ及びシュードモナス・インスエタの菌学的性質は次の通りである。

3

アクロモバクター・メタノーロフイラ

細胞形態：

2％メタノール肉汁寒天斜面に30℃，18～24時間培養

0.4～0.6×1.0～1.4ミクロンの単独または二連鎖状の杆菌。運動性なし。グラム染色陰性。

2％メタノール肉汁寒天コロニー：

円形。平滑。周縁は全縁。隆起状。光沢あり。不透明。灰色がかつた白色または暗い褐色がかつた灰色。バター状。

合成メタノール寒天コロニー：

円形。平滑。全縁。扁平状ないし凸円状。光沢あり。白色ないし暗い褐色。バター状。培地がわずかに褐色になることがある。

2％メタノール肉汁寒天斜面：

中等度の生育。糸状。光沢あり。不透明。灰色がかつた白色。

合成メタノール寒天斜面：

中等度の生育。糸状。光沢あり。半透明。褐色がかつた灰色。

肉汁寒天斜面：生育しない。

2％メタノール肉汁：

もろい皮膜または菌環を形成する。わずかに濁る。

肉汁：生育しない。

ゼラケンの液化：液化しない。

硝酸塩の還元：

2％メタノール硝酸ブロスより亜硝酸の生成はない。（菌株F36－1，F73－1はわずかに還元性を示す。）

酸の生成：

ヒュー・ライフソン（Hugh．Leifson）の方法で、メタノールより徐々に酸を生成するが、エタノール、グリセロール、キシロース、グルコース、シュークロース、ラクトースよりの酸の生成はない。

メタノールを唯一の炭素源として資化するが、エタノール、グルコース、酢酸、コハク酸、クエン酸は唯一の炭素源として資化しない。

生育温度：

25℃～30℃で生育良好。42℃ではごくわずか生育するかまたは生育しない。

分離源：野菜、果実。土壌。

本菌株は、上記の如く、グラム陰性の好気性杆菌で運動性を示さない、糖を資化せずまた糖より酸

4

も生成しない、メタノールを唯一の炭素源として生育する、特徴を有しかつ、バージーのマニュアル・オブ・デタミナテブ・バクテリオロジー（Bergey's Manual of Determinative Bacteriology）第7版の分類と対比するに厳密に此と固定すべき菌株の記載なく、従つて新菌種に属するものと考え、該菌種をアクロモバクター・メタノーロフイラと命名した。

シュードモナス・インスエタ

細胞形態：

2％メタノール肉汁寒天斜面に30℃、18～24時間培養

0.5×1.2～1.8ミクロンの杆菌。極鞭毛により運動する。グラム染色陰性。

2％メタノール肉汁寒天コロニー：

コロニーは小さい。円形、平滑。全縁。隆起状。光沢あり。半透明。暗い黄色がかつた灰色。バター状。

合成メタノール寒天コロニー：生育不良。

2％メタノール肉汁寒天斜面：

中等度の生育。糸状。光沢なし。不透明。灰色がかつた白色。

合成メタノール寒天斜面：生育中等度。

肉汁斜面：生育しない。

2％メタノール肉汁：中等度の濁りあり。沈渣を形成する。

ゼラチンの液化：液化しない。

硝酸塩の還元：2％メタノール硝酸ブロスより亜硝酸を生成する。

酸の生成：

ヒュー・ライフソン（Hugh Laifson）の方法で、メタノール、キシロース、グルコース、シュクロース、ラクトースよりゆつくり酸を生成する。グリセロールより酸の生成はない。

メタノールを唯一の炭素源として資化するが、エタノール、グルコース、酢酸、コハク酸、クエン酸は唯一の炭素源として資化しない。

生育温度：25℃～30℃で生育良好。

37℃で生育不良または中等度

分離源：土壌、野菜。

本菌株は上記の如く、グラム陰性の好気性杆菌で極鞭毛を有し運動する、メタノールを唯一の炭素源として利用し、メタノールや、グルコースなどの糖よりゆつくり酸を形成する、しかしメタノールを含まない肉汁寒天に生育しない特徴を有し

5

ている、また本菌株は既知のメタノール資化性菌のように赤色色素を生成しない、という特徴を有しバージーのマニュアル・オブ・デタミナチブ・バクテリオロジー（Bergey's Manual of Determinative Bacteriology）第7版の分類と対比するに厳密に此と同定し得る菌株の記載なく、従つて新菌種に属するものと考え、該菌種をシュードモナス・インスエタと命名した。

実験方法は何れも次の如き方法を用いた。

ゼラチンの液化：

2％メタノール、0.4％ゼラチンを含む肉汁寒天培地に9日間培養し、フレイガー（Fraiger）法により検出。

メタノール等の資化性：下記組成の培地にメタノールその他の被験体炭素源を唯一の炭素源として加え、30℃で5日間培養。

燐酸二カリウム1.0g、硝酸アンモニウム1.0g、硫酸マグネシウム0.5g、塩化カリウム0.2g、蒸留水1ℓ、PH7.0

硝酸塩の還元：硝酸クロス（Difco）にメタノールを2％加え30℃で9日間培養。1，3，5，7日後に亜硝酸の検出テストを行う。

合成メタノール培地

メタノール	2％（V/V）
硫酸アンモニウム	5　g
塩化ナトリウム	0.5 g
硫酸マグネシウム	0.2 g
硫酸第一鉄	0.01 g
硫酸マンガン	0.0088 g
燐酸一カリウム	2　g
イースト・エキス	0.2 g
蒸留水	1　ℓ

PH7.0

発酵に使用する培地の組成としては、主炭素源としてのメタノール、窒素源、無機物、ビタミンその他の生長促進物質を程よく含有する培地ならば、合成培地または天然培地何れでも使用可能である。

培地の炭素源としてはメタノールを使用するが、濃度等について種々の条件が必要である。メタノールは高濃度では微生物の生育を阻害するので培養中は高濃度を維持してはいけないことは明らかである。従つて最初に添加したメタノールのみで培養を終了させることも出来るが、低濃度で出発しメタノールの消費に合わせてフイードすることは良いことである。

6

培地の窒素源としては使用菌の利用可能な物質なら全て使用できるが、その種類は使用菌に応じて適当に選択される。

通常、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、燐酸アンモニウム等のアンモニウム塩、アンモニア、尿素また硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム等の硝酸塩等を0.2～4％程度の濃度において使用した場合に良好な結果が得られる。

炭素源、窒素源の他に培地には必要に応じて無機物としてリン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄、マンガン、亜鉛、モリブデンイオン等を、また生長促進物質として、ビタミンB_1、ビオチン、パントテン酸、ビタミンB_{12}等のビタミン類、メチオニン、システイン等のアミノ酸またはそれらを含有する「味液」（商標）等の大豆蛋白加水分解液、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン分解液、麦芽汁等の天然有機物等を添加する。また、使用菌が栄養要求性株である場合には、栄養要求物質を適当量添加することが必要である。

培養温度は20°～40℃で培地のPHを4～9に保持し、通常1～3日間振盪培養等の好気的条件下で培養を行う。培養中にアミノ酸その他の有機酸が生成し、又窒素源としてアンモニウム塩を使用するときは、アンモニアがアミノ酸、菌体生成のために消費されるため、培養液のPHが著しく低下する。従つて好適なPHを保持するためには、あらかじめ炭酸カルシウム、PH緩衝塩を添加するか、培養途上でアンモニア、苛性ソーダ等のアルカリを添加する。

培養終了後、菌体を除去し、以下、イオン交換法、濃縮晶析法等常法に従い生成蓄積したアミノ酸を単離する。

以下実施例により説明する。

実施例　1

メタノール	35　ml
硫酸アンモニウム	15　g
燐酸一カリウム	2　g
硫酸マグネシウム	0.2　g
塩化ナトリウム	0.5　g
硫酸マンガン	0.0088 g
硫酸第一鉄	0.01 g
炭酸カルシウム	25　g
蒸留水	1　ℓ

PH7.0

上記の組成の培地4mlを試験管に分注し、第1

7　　8

表に列挙した各菌株を接種し、30℃で2日間好　※に示した如き量のグルタミン酸が生成蓄積した。気的に振盪培養を行つたところ、それぞれ第1表※

第　1　表

使　用　菌		グルタミン酸生成量（mg/ℓ）
アクロモバクター・メタノーロフイラ	E95－1	310
〃　〃	E91－1	350
〃　〃	F48－3	100
〃　〃	E19－2	300
〃　〃	F73－1	300
シユードモナス・インスエタ	G8－3－2	146
〃　〃	G4－1－2	280
〃　〃	F27－3	230

実施例　2

実施例1に示した組成の培地に更に1ℓ当り0.2gの酵母エキスを添加した培地10mℓにシユードモナス・インスエタG8－3－2、F27－3、G4－1－2、アクロモバクター・メタノーロフイラF73－1菌を夫々接種し30℃で2日間試験管振盪培養を行つた。培養液についてバイ＊

＊オアツセイを行つたところ、夫々第2表に示した如き量のアミノ酸が蓄積していた。（実施例記載の生成アミノ酸量はすべて培地中に含有しているアミノ酸量を差引いて表示した。以下の実施例においても同じ。）

第　2　表

アミノ酸生成量（mg／ℓ）

使　用　菌	グルタミン酸	リジン	グリシン	アルギニン	フエニルアラニン
アクロモバクター・メタノーロフイラF73－1					17
シユードモナス・インスエタ　G8－3－2	466		23	13	
〃　〃　F27－3	335				31
〃　〃　G4－1－2		11.6			

実施例　3

実施例1に示した組成の培地に更に1ℓ当り

チアミン塩酸塩	1000μg	パントテン酸カルシウム	1000μg
リボフラビン	1000μg	ニコチン酸	1000μg
ピリドキシン	1000μg	パラ・アミノ安息香酸	200μg
		ビオチン	2μg
		葉酸	50μg

「味　液」　　2ml
を添加した培地に、表に列挙した各種微生物を接種し30℃で2日間好気的に振盪培養を行つたと※ころ、それぞれ第3表に示した如き量のグルタミン酸が生成蓄積していた。

第　3　表

使　用　菌		グルタミン酸生成量（mg/l）
アクロモバクター・メタノーロフイラ	F54－2	100
〃　〃	E95－1	605
〃　〃	E91－1	565
〃　〃	F36－1	90
〃　〃	E19－2	260
〃　〃	F73－1	270
シユードモナス・インスエタ	F27－3	425
〃　〃	08－3－2	690

実施例　4

実施例3におけると同じ培地にアクロモバクター・メタノーロフイラE19－2、F73－1、シユードモナス・インスエタF27－3菌を接種＊し、30℃で2日間振盪培養を行つた際の培養液中の各種アミノ酸の蓄積量は第4表の通りである。

第　4　表

菌名 / アミノ酸	シユードモナスF27－3	アクロモバクダーE19－2	アクロモバクターF73－1
アラニン	117mg/l		
イソロイシン	45 〃		82mg/l
ロイシン	125 〃		171 〃
スレオニン	11 〃		21 〃
バリン		314mg/l	
プロリン	17 〃	23 〃	
チロシン	9 〃	5 〃	

実施例　5

実施例3におけると同じ培地にアクロモバクター・メタノーロフイラF54－2、F48－3、シユードモナス・インスエタF27－3菌を接種☆し、30℃で2日間振盪培養したところ、培養液中に次のアミノ酸が蓄積していた。

第　5　表

菌　名		アミノ酸蓄積量
アクロモバクター・メタノローフイラ	F54－2	アラニン　187mg/l
〃　〃	F48－3	セリン　81 〃
シユードモナス・インスエタ	F27－3	バリン　136 〃

11

特許請求の範囲

1　メタノールを主炭素源とする培地に、アクロモバクター属またはシュードモナス属に属し、メタノール資化性、アミノ酸蓄積能を有する菌株を

12

接種、培養し、アミノ酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする発酵法によるアミノ酸の製造法。